

Rec'd

2003

17 MAR 2003

PCT/JP03/11389

10/526744

日 本 国 特 許 庁

JAPAN PATENT OFFICE

03.10.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 2 年 9 月 6 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 2 - 2 6 1 6 6 6
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 2 - 2 6 1 6 6 6]

出 願 人
Applicant(s): 株式会社先端生命科学研究所

REC'D 21 NOV 2003

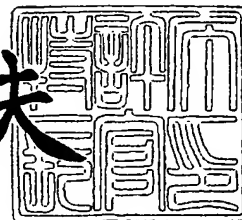
WIPO PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 3 年 1 1 月 6 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特 2 0 0 3 - 3 0 9 1 5 8 2

【書類名】 特許願

【整理番号】 1024582

【提出日】 平成14年 9月 6日

【あて先】 特許庁長官 太田 信一郎 殿

【国際特許分類】 C12N 15/33

【発明の名称】 粒子形成能を有するHBVプレコア／コア蛋白

【請求項の数】 15

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県和光市丸山台2丁目10番23号 株式会社先端
生命科学研究所内

【氏名】 槇 昇

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県和光市丸山台2丁目10番23号 株式会社先端
生命科学研究所内

【氏名】 木村 達治

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県和光市丸山台2丁目10番23号 株式会社先端
生命科学研究所内

【氏名】 八木 慎太郎

【特許出願人】

【識別番号】 399115851

【氏名又は名称】 株式会社先端生命科学研究所

【代理人】

【識別番号】 100077517

【弁理士】

【氏名又は名称】 石田 敬

【電話番号】 03-5470-1900

【選任した代理人】

【識別番号】 100092624

【弁理士】

【氏名又は名称】 鶴田 準一

【選任した代理人】

【識別番号】 100087871

【弁理士】

【氏名又は名称】 福本 積

【選任した代理人】

【識別番号】 100082898

【弁理士】

【氏名又は名称】 西山 雅也

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 036135

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9911904

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 粒子形成能を有するHBVプレコア/コア蛋白

【特許請求の範囲】

【請求項1】 HBVのコア様粒子形成能を有する、シグナル配列の全部または一部を含むHBVプレコア/コア蛋白。

【請求項2】 配列番号1に記載されたアミノ酸配列からなる請求項1に記載のHBVプレコア/コア蛋白。

【請求項3】 請求項1または2に記載のHBVプレコア/コア蛋白を含んでなるHBVコア（様）粒子またはHBVウイルス（様）粒子。

【請求項4】 請求項1または2に記載のHBVプレコア/コア蛋白を含んでなるHBVワクチン、または治療薬。

【請求項5】 請求項1または2に記載のHBVプレコア/コア蛋白を含んでなるHBV診断薬または診断キット。

【請求項6】 請求項1または2に記載のHBVプレコア/コア蛋白を測定する方法。

【請求項7】 請求項1または2に記載のHBVプレコア/コア蛋白を露出させる工程、およびHBVプレコア/コア蛋白を認識するプローブと結合する工程を含む請求項6に記載の方法。

【請求項8】 前記HBVプレコア/コア蛋白を露出させる工程が界面活性剤の処理または添加である請求項6または7に記載の方法。

【請求項9】 前記界面活性剤が陰イオン性界面活性剤である請求項6～7いずれかに記載の方法。

【請求項10】 前記HBVプレコア/コア蛋白に結合するプローブがアミノ酸配列の-28～-11に結合するプローブである請求項6～9いずれかに記載の方法。

【請求項11】 前記HBVプレコア/コア蛋白に結合するプローブが抗体である請求項6～10いずれかに記載の方法。

【請求項12】 請求項6～11に記載の方法により測定したHBVプレコア/コア蛋白の測定値に遊離のHBe抗原の値が含まれている場合に、HBe抗原の測定値

を減算ことにより算出する検体中の粒子状HBVプレコア／コア蛋白の値を測定する方法。

【請求項 13】 請求項 6～12 に記載の方法により測定したHBVプレコア／コア蛋白の測定値よりHBc抗原の測定値を減算することにより算出する検体中の粒子状HBVプレコア／コア蛋白の値を測定する方法。

【請求項 14】 請求項 6～13 いずれかの方法で測定したHBVプレコア／コア蛋白の定量をHBV感染の病態マーカーとして利用する方法。

【請求項 15】 陰イオン性界面活性剤およびHBVプレコア／コア蛋白の28～150番目のアミノ酸を認識する抗体を含む測定キットおよびHBe抗原を測定するキットを含む診断薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、HBVウイルスのコア様粒子形成が可能なHBVプレコア／コア蛋白質に関する。

【0002】

【従来の技術】

ウイルス感染の診断は、主にウイルスやウイルス関連成分（蛋白や核酸）を検出する方法と、ウイルス感染により生体が産生する特異抗体を測定する方法とによって行われる。B型肝炎ウイルス（HBV）感染においては、HBs抗原・抗体、HBc抗体、HBe抗原・抗体、HBV-DNAなどの診断マーカーが日常検査法として導入されている。

【0003】

通常、HBV感染の有無はHBs抗原やHBc抗体により知ることができる。また、HBVの感染性のみならず、HBVキャリアの病態や予後、治療の効果判定の指標としては、HBe抗原・抗体、HBV-DNA量の測定が用いられる。中でもHBe抗原・抗体免疫測定法は操作が簡便で安価なため最も汎用されているが、HBe抗原を産生・分泌できないプレコア変異株では、HBe抗原が陰性であってもHBVの増殖が旺盛で、感染性や免疫原性が強く病態も活動的な症例が存在する。一方、野生株や変異株に

かかわらず、HBVの増殖・複製状態を反映するHBV-DNA量の測定が重要となるが、前処理法や測定法が煩雑で、再現性や安定性に欠けるという問題点がある。

【0004】

最近、HBVコア関連抗体（HBc抗体およびHBe抗体）の存在下や変異株の出現にかかわらず、HBVの増殖・複製状態を反映すると考えられるHBVコア関連抗原を測定する方法が開発された。Kimuraら（Journal of Clinical Microbiology, 40, 439-445, 2002）は、HBVコア関連抗原（HBc抗原及びHBe抗原を含むHBVプレコア/コア遺伝子産物）に対して特異性を有するモノクローナル抗体を用いて、簡便な前処理法により血清中のHBc抗原とHBe抗原を同時に検出する免疫測定方法を開発し、ウイルスゲノムを検出するNAT検査法と相関を持つことを示した。

【0005】

これまでの文献報告では、HBVプレコア/コア遺伝子は全長212アミノ酸残基（アミノ酸番号：-29～183（HBc抗原の一番目のアミノ酸を1とした場合。以下同様））からなるタンパクをコードし、そのN末端には19残基のシグナルペプチドを有する。シグナルペプチドとは疎水性のアミノ酸残基からなり、分泌蛋白が膜に結合するためのシグナル配列として機能する。ここでは-29～-11番目のアミノ酸からなる配列を指す。

【0006】

プレコア/コア蛋白は翻訳されると小胞体膜を通過し19残基のシグナルペプチド切断後、C末端核酸結合ドメインが切断されHBe抗原（アミノ酸番号：-10～149）となり血中に分泌される。従来このHBe抗原は血中ではアルブミンやγグロブリンなどの血清蛋白と結合して存在すると考えられ、HBV粒子を形成しているとの報告はなかった。またHBe抗原は、免疫寛容の維持、ウイルス複製の抑制などにかかわっているとの報告も見られるが、HBVの複製には不可欠ではなく、その生物学的役割については不明な点が多い。

【0007】

また、HBVプレコア/コア遺伝子は2番目の転写開始シグナルを持ち、この開始シグナルから転写翻訳された産物はHBc抗原（アミノ酸番号：1～183）となり、HBV pregenome RNAを取り込みながらウイルスキャプシドを形成し、HBs抗原からな

る外皮(エンベロープ)をまとった後、細胞外に完全ウイルス粒子(Dane粒子)として放出される。このHBc抗原のうち、1-144番目のアミノ酸が存在すれば、コア粒子の形成が起こることが報告されているが、感染性のウイルスのコア粒子を形成している分子は1-183番目のアミノ酸配列の蛋白から構成されていると考えられている。

【0008】

上記のようにHBc抗原とHBe抗原は、大部分共通の配列を持つ蛋白でありながら大きく異なる性質を持っている。この性質の違いに重要な働きをしているのはHBe抗原のアミノ酸-7番目にあるシステイン残基である。このシステインは同じ分子内のアミノ酸61番目のシステイン残基とジスルフィド結合を形成し、e抗原性を獲得する(M. Nassal and A. Rieger, Journal of Virology, 67; 4307-4315, 1993)。-7番目のシステインを他のアミノ酸に変異させるなどしてこのジスルフィド結合を形成できないようにすると、HBe抗原のコンフォメーションはとらないことからこのジスルフィド結合の重要性が示されている。

【0009】

一方HBc抗原は1番目のアミノ酸部位から転写翻訳されるためアミノ酸-7番目にあるシステイン残基を持たず、HBcコンフォメーションをとり、2分子のHBc蛋白がアミノ酸61番目のシステイン残基どうしのジスルフィド結合形成によりホモ2量体となり、ウイルスキャプシド(コア粒子)を形成する。

【0010】

HBV患者血清中に存在するHBVコア関連抗原は、主に感染性を有するDane粒子を構成するHBc抗原(アミノ酸番号: 1-183)、および、HBc抗原とアミノ酸配列上はほとんど同様であるがHBc抗原とは抗原性が異なる分泌性のHBe抗原(アミノ酸番号: -10-149)に大別される。しかしながら、この他に血中のマイナー分子としてHBe抗原性を示すプレHBe抗原(アミノ酸番号: -29-149)の存在がTAKAHASHIら(Journal of Immunology, 147, 3156-3160, 1991)により明らかにされている。

【0011】

彼らはプールした血清を超遠心で分離し、上清より抗HBeモノクローナル抗体

のアフィニティーカラムでHBe抗原性を持つ蛋白を精製し、その配列を決定した。HBe抗原蛋白質は前述したように、ウイルス粒子を形成せず血中に存在すると考えられる。彼らもHBVの外皮蛋白であるHBs抗原を剥離（破壊）する処理あるいはウイルス粒子、コア粒子を破壊するような処理を行わずに精製したHBe抗原配列を決定しており、彼らが証明したシグナル配列を持つHBe抗原（アミノ酸番号：-29～149）は血清中に遊離して存在すると考えられる。

【0012】

また一方で、Dane粒子の中には、HBV-DNAを含まない空粒子（SAKAMOTO et al. Laboratory Investigation, 48, 678-682, 1983）やスプライシングを受けた通常より短いHBV-DNAを含む複製不可能な欠損粒子が存在すること（TERRE et al. Journal of Virology, 65, 5539-5543, 1991）が報告されているが、その粒子を形成しているHBVタンパクの詳細な解析は行われていない。

このように、これらの文献で解析されている血中でのHBVコア関連抗原の生化学的分析は十分とはいえず、HBVの増殖・複製状態を反映すると考えられるHBVコア関連抗原のウイルスマーカーとしての血中における存在様式は未解明のままである。

【0013】

【非特許文献1】

Kimuraら, Journal of Clinical Microbiology, 40, 439-445, 2002

【非特許文献2】

TAKAHASHIら, (Journal of Immunology, 147, 3156-3160, 1991

【非特許文献3】

SAKAMOTO et al. Laboratory Investigation, 48, 678-682, 1983

【非特許文献4】

TERRE et al. Journal of Virology, 65, 5539-5543, 1991

【0014】

【発明が解決しようとする課題】

臨床的有用性の高いHBVのNAT検査には、現在PCR法及びTMA法があるが、検査コストが高く付く上に操作が煩雑であることが問題点として挙げられる。また、遺

伝子増幅法を用いているため、増幅用プライマーが標的DNAと一致しないと偽陰性を引き起こす。一方、免疫測定法は操作が簡便で安価に測定できるが、増殖マーカーとしての現行のHBe抗原測定法では、HBe抗体の存在下では免疫複合体として存在するHBe抗原を測定できないし、HBe抗原を産生・分泌できないプレコア変異株、コアプロモーター変異株では、HBe抗原が陰性となる。また、HBc抗原測定法は、HBV-DNA量と相関はあるものの、前処理が繁雑で感度不足のため臨床応用されていない。

【0015】

従って本発明の目的は、B型肝炎のスクリーニングやB型慢性肝炎患者の治療におけるモニタリングなどに臨床応用され则认为られるHBVコア関連抗原を生化学的に分析し、HBVの増殖・複製状態を反映する血中のHBVコア関連抗原の分子種を同定することである。

こうした解析により、HBV感染患者の診断等に有用な分子種を発見し、新たな診断薬を開発することができる。

また、HBVコア関連抗原の存在様式およびその役割を解析することで、新たなHBVワクチン、治療薬の開発につなげることができる。

【0016】

【課題を解決するための手段】

本発明は、血中のHBV粒子及びHBV関連蛋白をショ糖密度勾配遠心法やELISA、電気泳動法等を用いることで、HBVコア関連抗原を分離精製し、従来報告されているHBe抗原及びHBc抗原とは異なる抗原を単離し、質量分析法により新規なコア様粒子を形成する分子を同定した。本発明の1つの態様はウイルス様粒子形成能のあるシグナル配列の全部または一部を含むHBVプレコア/コア蛋白を提供することである。

【0017】

ここで一部とは19残基のシグナル配列のうちC末側からの1残基以上の配列である。またこのHBVプレコア/コア蛋白のN末端はアミノ酸番号で150番目以降のRRGRのいずれかの部位で切断されたものである。さらにシグナル配列あるいはHBe配列部分（アミノ酸番号：-10～149）に変異を含んでも良く、許容される変異

はコア様粒子を形成できる範囲ならば構わない。このHBVプレコア/コア蛋白は、最も好ましくは配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドである。

【0018】

さらに本発明は上記のHBVプレコア/コア蛋白を含んでなるHBVコア様粒子またはHBVウイルス様粒子を提供する。

またこのHBVプレコア/コア蛋白、あるいはこの蛋白から構成されたHBVコア様粒子、HBVウイルス様粒子を含むHBV診断薬あるいはキットを提供する。

さらにこのHBVプレコア/コア蛋白を測定する方法、あるいは診断薬、診断キットを提供する。

このHBVプレコア/コア蛋白の測定法はHBVプレコア/コア蛋白を露出させる工程、HBVプレコア/コア蛋白を認識するプローブと結合させる工程を含んでもよい。またHBVプレコア/コア蛋白を露出させる工程が界面活性剤の処理または添加であっても良い。この界面活性剤は限定されず非イオン性界面活性剤も有効であるが、特に陰イオン性界面活性剤が適している。

【0019】

さらに前記HBVプレコア/コア蛋白に結合するプローブがアミノ酸番号の-28~-11の配列に結合するプローブであっても構わない。このプローブが抗体であっても良い。

上記の測定法により測定したHBVプレコア/コア蛋白の測定値に遊離のHBe抗原の値が含まれている場合に、HBe抗原の測定値を減算することにより検体中の粒子状HBVプレコア/コア蛋白の値を算出し、測定することも可能である。さらにその値よりHBc抗原の測定値を減算することにより検体中の粒子状HBVプレコア/コア蛋白の正確な値を測定することも可能である。この測定した粒子状HBVプレコア/コア蛋白の定量値はHBV感染の病態マーカーとして利用できる。

【0020】

さらに本発明は陰イオン性界面活性剤およびHBVプレコア/コア蛋白の-28~-150番目のアミノ酸を認識する抗体を含む測定キットおよびHBe抗原を測定するキットを含む診断薬を提供する。

本発明の別の形態としてHBVプレコア/コア蛋白を含んでなるHBVワクチン、お

よび治療薬を提供する。

【0021】

【発明の実施の形態】

以下、本発明について詳細に説明する。

本発明で新規に同定したHBVプレコア/コア蛋白とは、シグナル配列を含み且つHBVのウイルス様粒子を形成することのできる蛋白質である。血液中の本発明の蛋白質の主な分子は分子量22000ダルトンからなるp22抗原である。p22抗原の代表的なアミノ酸配列は配列番号1に記載される178アミノ酸からなるHBVのプレコア抗原に類似の抗原である。この抗原を特異的に認識する抗体を取得し、検体前処理法と組み合わせて測定系を構築することにより、抗体存在下でもHBVコア関連抗原を測定することが可能となる。

【0022】

一般的にHBVプレコア/コア蛋白と呼ばれ得るものにはHBe抗原（HBV e蛋白）、HBc抗原（HBVコア蛋白）および他のHBVプレコア/コア遺伝子産物があるが、本発明において「HBVプレコア/コア蛋白」と呼ぶ場合には、特に断らない限りシグナル配列を含み粒子形成能を有するHBVプレコア/コア遺伝子産物である蛋白を示す。この代表的なものは配列表1に示す蛋白である。また、「HBVコア関連抗原」はHBc抗原（HBVコア蛋白）、HBe抗原（HBV e蛋白）を含むHBVプレコア/コア遺伝子産物を示す。

【0023】

まず、B型肝炎患者血清をショ糖密度勾配遠心法にて分画し、各分画のHBVコア関連抗原を測定したところ、HBe抗原と同様の密度1.05付近に一つのピークを、密度1.17付近のHBc抗原とHBV-DNAとほぼ同じ分画に、もう一つのピークを検出できる。さらに、密度1.17付近のピークを低勾配のショ糖密度勾配遠心法にて再分画すると、HBc抗原とHBV-DNAは同じ分画にピークを示すが、HBVコア関連抗原はこれよりわずかに低密度分画にピークを示し、その分画にはウイルスの外被蛋白であるHBs抗原が検出できる。

すなわち、B型肝炎患者血清中には、感染性を示すDane粒子のほかに、少し比重の軽いHBVコア関連抗原からなるウイルス様粒子が存在すると考えられる。

【0024】

また、そのHBVコア関連抗原からなる粒子とDane粒子を含む画分をゲルろ過にかけると、HBc抗原とHBVコア関連抗原からなる粒子がそれぞれボイド画分に溶出する。また、同じ画分をノニデットP-40 (NP-40:ナカライテスク) 処理し、外被蛋白のHBs抗原を剥がした後、ゲルろ過にかけると、HBc抗原とHBVコア関連抗原からなる粒子はやはりそれぞれボイド画分に溶出する。このことは、HBc抗原とHBVコア関連抗原からなる各々の粒子が、外被蛋白のHBs抗原を剥がされる界面活性剤処理によっても壊されない強固なキャプシド構造を形成していることを示している。

【0025】

つぎに、ウエスタンブロット法を用いた解析から、そのHBVコア関連抗原はHBc抗原とほぼ同じ22000ダルトンの分子量を示したが、HBc抗原が有するC末端核酸結合領域に特異的なモノクローナル抗体 (HB50) には反応しない。つまり、このHBVコア関連抗原は、その分子量からC末端核酸結合領域を含まず、シグナル配列の切断されていないプレコア遺伝子産物 (p22抗原) と考えられる。

【0026】

p22抗原をSDS-PAGE法にて分離後、ポリアクリルアミドゲルより切出し、マトリックス支援型レーザー脱離イオン化 (MALDI) 質量分析法 (Carr et al. Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York Units, 1997) によりアミノ酸配列を決定すると、p22抗原は配列番号1に記載の178アミノ酸からなるHBVプレコア/コア蛋白であることが明らかとなった。

【0027】

このアミノ酸配列を決定したHBVコア関連抗原を以下HBVプレコア/コア蛋白と呼ぶが、本発明のHBVプレコア/コア蛋白は従来報告されていたHBVプレコア/コア蛋白と比較するとN末 (-29番目) のメチオニンを欠いており、-28番目のグルタミンがアセチル化されている。またC末側はHBe抗原のC末である149番目のバリンにアルギニンが結合しており、少なくとも150番目までが存在している。このHBVプレコア/コア蛋白はHBV核酸結合部位のうちSPRRRを含む部位を認識するモノクローナル抗体HB50では認識されないことから、154番目までのアミノ酸を含

む可能性がある。

【0028】

本発明のHBVプレコア/コア蛋白が不完全ウイルス粒子（ウイルス様粒子）を形成することから、このタンパクがキャプシド形成にあたりHBc抗原と競合してウイルス複製を阻害することが容易に推測される。したがって、本発明はHBVプレコア/コア蛋白を用いたHBV治療薬の可能性を提示する。

本発明のHBVプレコア/コア蛋白はHBV感染患者の体内で、HBVウイルス様粒子を形成している。また本発明は、このHBVプレコア/コア蛋白が完全HBVウイルス粒子中に存在することも示唆している。すなわち、HBVプレコア/コア蛋白がHBc抗原と共にHBVヌクレオキャプシドを形成していると考えられる。したがって、このHBVプレコア/コア蛋白を測定することはHBV感染の診断、肝炎や肝硬変あるいは肝癌の病態の診断、マーカーとして役立つと考えられる。

【0029】

本発明のHBVプレコア/コア蛋白と既知のHBe抗原、HBc抗原はその機能やアミノ酸配列が異なる。しかしながら、機能的に似ている性質やアミノ酸配列の重複があるため、このHBVプレコア/コア蛋白を測定するためには、HBe抗原、HBc抗原と区別して測定することが必要である。ただし、後述の実施例7に示すようにこのHBVプレコア/コア蛋白とHBc抗原の量の比は12:1～158:1と最低でも12倍以上の開きがあり、実際上は臨床的に区別する必要はない。

【0030】

本発明のHBVプレコア/コア蛋白とHBe抗原あるいはTakahashiらの報告しているシグナルペプチドを持つHBe抗原との違いは、機能的に前者がHBVのコア様粒子（ウイルス様粒子）を形成しているのに対し、後者が遊離の状態で血液中では血清蛋白と結合して存在している点である。このコア様粒子（ウイルス様粒子）を形成するという機能に関してはこのHBVプレコア/コア蛋白とHBc抗原は、ほぼ同じ機能を有している。このHBVプレコア/コア蛋白は粒子形成という性質を持つことから、HBe抗原よりはHBc抗原に近い構造を有しているものと推測され、アミノ酸7番目のシステインと61番目のシステイン間のジスルフィド結合は形成されていないものと考えられる。

【0031】

また本発明のHBVプレコア/コア蛋白と既知のHBe抗原、Takahashiらの報告しているシグナルペプチドを持つHBe抗原、HBc抗原のアミノ酸配列に関する相違点は図1に示した。HBVプレコア/コア蛋白は本発明より-28~150番目のアミノ酸配列からなるポリペプチドが代表的なものであると考えられる。これに対し、HBe抗原は-10~149番目のアミノ酸配列、シグナルペプチドを持つHBe抗原は-29~149番目のアミノ酸配列、HBc抗原は1-183番目のアミノ酸配列からなるポリペプチドで構成されている。

【0032】

上記のようなことから、本発明のHBVプレコア/コア蛋白とHBe抗原、シグナルペプチドを持つHBe抗原、HBc抗原を分離して測定するのは容易ではないが、そのウイルス粒子を形成できるかできないかの機能と、アミノ酸配列の違いを利用して分離することが可能である。

【0033】

まず本発明のHBVプレコア/コア蛋白とHBe抗原あるいはシグナルペプチドを持つHBe抗原を分離するためには、このHBVプレコア/コア蛋白はHBV様粒子を形成しており、HBe抗原あるいはシグナルペプチドを持つHBe抗原は遊離の状態で存在しているという特徴を利用する。実際には、

(1)ウイルス粒子を破壊する処理を行う前に測定した測定値とウイルス粒子を破壊する処理を行った後に測定した測定値を比較する方法がある。つまりウイルス粒子を破壊する処理を行った後に測定した測定値からウイルス粒子を破壊する処理を行う前に測定した測定値を引くことによって測定可能である。

【0034】

(2)またウイルス粒子を分離して、その中に含まれているHBVプレコア/コア蛋白を測定する方法もある。このウイルス粒子を分離する方法には、例えば密度勾配遠心で遊離の抗原の分画とウイルス粒子を形成している分画を分ける方法があり、ウイルス粒子の含まれている分画のHBVプレコア/コア蛋白を測定すればよい。この密度勾配遠心で遊離の抗原とウイルス粒子を分離する方法以外にも、ウイルス粒子を特異的に濃縮する方法や遊離の抗原を特異的に除く方法を用い、分離

後にHBVプレコア/コア蛋白の量を測定すればよい。

【0035】

またHBVプレコア/コア蛋白とHBc抗原はコア（様）粒子（ウイルス（様）粒子）の形成の機能で類似しているため、分離して測定するためには構成するアミノ酸配列が異なる部分に特異的に結合（認識）するプローブを使い分ける方法が考えられる。つまり、HBVプレコア/コア蛋白を選択的に測定するためには、-29～-10番目のアミノ酸に結合するプローブを使用すればよく、HBc抗原を選択的に測定するためには151～183番目に結合するプローブを使用すればよい。

【0036】

また、両方に結合するプローブを使用し、HBVプレコア/コア蛋白+HBc抗原の抗原量を測定し、その後いずれかの抗原（蛋白）を特異的に測定し、減算することによっても、それぞれの抗原（蛋白）の量を測定可能である。ただし、前述したようにHBVプレコア/コア蛋白とHBc抗原の検体中の存在量は、12:1～158:1と最低でも12倍以上の差があるため、HBVプレコア/コア蛋白の測定には、HBc抗原と分離して測定する必要性は少なく、HBVプレコア/コア蛋白とHBc抗原をまとめて測定しても、そのほとんどがHBVプレコア/コア蛋白であり、臨床上的影響はないと考えられる。

【0037】

實際上、検体中のHBVプレコア/コア蛋白を測定には、ウイルス様粒子の破壊を行い、HBVプレコア/コア蛋白を露出させる工程が必須である。この工程ではウイルスの外皮蛋白質であるHBs抗原の剥離を行い、HBVプレコア/コア蛋白を遊離させる処理剤を使用する。処理の方法としては、アルカリ処理があり、NaOH等の処理により、HBs抗原がはがれ、HBVの内部の抗原が遊離する。また他の処理剤としては界面活性剤が使用可能であり、Triton X-100やNonidet P-40のような非イオン性界面活性剤やSDSやサルコシン酸ナトリウムのような陰イオン性界面活性剤が適当である。さらに特許3171827号に出願されているような陰イオン性界面活性剤と他の界面活性剤の組み合わせも有効である。

【0038】

このウイルス様粒子の破壊、HBVプレコア/コア蛋白の露出の工程を行わずに、

−29〜149のアミノ酸を認識するプローブで測定を行うと遊離のHBe抗原あるいはシグナルペプチドを持つHBs抗原をも測定することとなる。そのため遊離の抗原とウイルス様粒子の分離を行わずに、検体中の抗原、蛋白を測定した場合は、界面活性剤等による処理を行った測定値から界面活性剤などの処理を行わずに測定したHBe抗原の測定値を減算したものが、粒子状HBVプレコア/コア蛋白の測定値となると考えられる。

【0039】

界面活性剤によるウイルス粒子の破壊、HBVプレコア/コア蛋白の露出（露呈）の後、HBVプレコア/コア蛋白を認識するプローブによる測定の工程がある。この工程ではアミノ酸配列の−28〜150番目を認識するプローブを用いることにより、HBVプレコア/コア蛋白の測定が可能である。プローブとしてはこのプレコア/コア蛋白に結合するものであればよく、抗体、レセプター、アプタマー、リガンドなどが使用可能である。

【0040】

測定法としては、HBVプレコア/コア蛋白とプローブの結合を利用したものであれば良く、代表的なものとしては酵素抗体免疫法などがある。HBVプレコア/コア蛋白とHBc抗原を分離して測定するためには、HBVプレコア/コア蛋白は−28〜−11を認識するプローブを使用し、HBc抗原は151-183を認識するプローブを使用すればよい。しかしながら、共通領域である1-150を認識するプローブでHBVプレコア/コア蛋白とHBc抗原の合計の量を測定し、それから151-183を認識するプローブを用い、HBc抗原の量を測定し、合計の量から減算することによっても、HBVプレコア/コア蛋白を定量することは可能である。

【0041】

【実施例】

以下の実施例は本発明を例証するものであるが、これによって本発明の範囲を制限するものではない。

実施例1. HBVコア関連抗原のショ糖密度勾配遠心法による分画

(A) 10〜60%ショ糖密度勾配遠心法による分画

TNE緩衝液 [10mM Tris-HCl (pH7.5), 150mM NaCl, 1mM EDTA] にショ糖をそれぞれ

れ10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%と溶解させ、密度の重い60%シヨ糖液から順に1.7mlずつ、12mlの超遠心チューブに注意深く重層させ、室温で6時間放置した。

【0042】

HBe抗原陽性血清1mlを作製したシヨ糖密度勾配液の上に重層し、Sw40Tiローター (Beckman) を用いて、33.4Krpm、4℃で15時間の超遠心分離の後、上清から300 μ lずつ40分画した。それぞれの画分の密度を計算し、HBVコア関連抗原 (PCT出願: PCT/JP01/06947)、HBs抗原 (ダイナボット)、HBe抗原 (ダイナボット)、HBV-DNA PCR (ロシュ・ダイアグノスティック) を測定したところ、HBVコア関連抗原の一部はHBe抗原と同様の密度にピークを示したが、大部分のHBVコア関連抗原はHBV-DNA PCRのピーク付近に検出された(図2)。

【0043】

(B) 低勾配のシヨ糖密度勾配遠心法による再分画

30%, 40%, 50%のシヨ糖液を、密度の重い50%シヨ糖液から順に3.4mlずつ、12mlの超遠心チューブに注意深く重層させ、室温で6時間放置する。(A) の24番目と25番目のピーク画分をTE緩衝液[10mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA]で2倍に希釈後、作製したシヨ糖密度勾配液の上に重層し、Sw40Tiローター (Beckman) を用いて、33.4Krpm、4℃で15時間の超遠心分離の後、上清から300 μ lずつ40分画した。それぞれの画分の密度を計算し、HBVコア関連抗原 (PCT出願: PCT/JP01/06947、実施例5)、HBc抗原 (PCT出願: PCT/JP01/06947、実施例6)、HBs抗原、HBV-DNA PCRを測定したところ、HBVコア関連抗原のピークはHBV-DNA PCRのピークよりも低密度分画にシフトし、その分画にはHBs抗原が含まれていた(図3)。各々のピークを透析後、4℃で保存した。

【0044】

実施例2. NP-40処理によるゲルろ過

前記実施例1の(A)により分画したピーク画分(24-25番)を0.15M NaClを含む10mMリン酸緩衝液 (pH7.3) (PBS)で平衡化されたSuperose 6 HR (Amersham)を用いてゲルろ過したところ、HBVコア関連抗原とHBc抗原の粒子がそれぞれボイド画分に溶出した(図4上図)。一方、前記実施例1の(A)により分画したピーク画

分(24-25番)にNP-40が最終濃度3%となるように加え、HBs抗原を剥ぎ取るために37℃にて15分間処理した。0.15M NaClを含む10mMリン酸緩衝液(pH7.3)(PBS)で平衡化されたSuperose 6 HR(Amersham)を用いてこれをゲルろ過したところ、HBVコア関連抗原とHBc抗原からなる裸の粒子がそれぞれボイド画分に溶出した(図4下図)。Superose 6 HRのボイド画分は分子量40,000,000以上であり、これらの分子はウイルスキャプシド様粒子構造をとっているものと考えられる。

【0045】

実施例3. ウェスタンブロット法による解析

HBe抗原陽性血清を実施例1の(A)に記載の方法と同様にしてショ糖密度勾配遠心を行い、上清から600 μ lづつ20分画する。この分画およびHBe抗原陽性血清を用いてSDS-PAGEを行い、PVDF膜(イモビロン、Millipore)に転写した後、HBc抗原とHBe抗原両方を認識するモノクローナル抗体HB91とHBc抗原のC末端核酸結合領域に特異的なモノクローナル抗体HB50を用いたウェスタンブロットにより、分子量約22000ダルトンのHBVコア関連抗原を検出した(図5上図)。また、このHBVコア関連抗原はHB91には反応するがHB50とは反応しないことが明らかになった(図5下図)。

【0046】

HB50抗体はエピトープ解析により、168-176番目のアミノ酸(SQSPRRRRS)を認識することがわかっているが、この他に141-159番目のペプチド(STLPETTVVRR RGRSPRRR)および150-167番目のペプチド(RRRGRSPRRRTSPRRRR)にも反応することがわかっている。これらのペプチドの共通配列はSPRRRであり、少なくともこの配列がHB50抗体との結合に必要である。つまり、このSPRRR配列は155番目以降に存在するため、本願発明のHBVプレコア/コア蛋白は155番目以降の配列を欠いているものと考えられる。このことはHB50抗体を標識抗体として単独で用いているHBc抗原測定系でのピークがHBVプレコア/コア蛋白のピークと重ならないことから明らかである(図2、図3)。

【0047】

実施例4. MALDI質量分析によるアミノ酸配列の解析

実施例1(A)に記載の方法によって得られたHBVコア関連抗原画分を、0.15M

NaClを含む10mMリン酸緩衝液 (pH7.3) (PBS) で平衡化されたSuperose 6 HR (Amersham) を用いてゲルろ過したところ、HBVコア関連抗原とHBc抗原からなる粒子がボイド画分に溶出した。このボイド画分を1% NP-40, 20% ショ糖を含むTNE緩衝液 [10mM Tris-HCl (pH7.5), 150mM NaCl, 1mM EDTA] 上に重層し、Sw40Tiローター (Beckman) を用いて、33.4Krpm、4℃で15時間の超遠心分離後、HBVコア関連抗原粒子を含むペレットを回収した。

【0048】

このペレットをSDS-PAGEにて分離し、22kDaのHBVコア関連抗原のバンドを切り出し、トリプシン消化後、Voyager-DE STR (Applied Biosystems) にてMALDI-TOF質量分析を行った。その結果、配列番号2、3、4、5および6の配列に相当する5つのペプチドを検出した。このうち配列番号2のペプチドはN末端アセチル化されていた。

【0049】

実施例5. HBVコア関連抗原の検出および測定法

抗HBVコア抗原モノクローナル抗体HB44 (認識部位31-49アミノ酸)、HB61 (認識部位131-140アミノ酸) およびHB114 (認識部位1-81アミノ酸) を終濃度がそれぞれ2, 1, 1 μ g/mlになるように0.5M NaCl, 0.1M炭酸緩衝液 (pH9.6) で希釈し、黒色96ウェルマイクロプレート (ヌンク社) につき100 μ l/ウェル分注し、4℃で一晩静置した。0.15M NaClを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.4) 0.4mlで2回洗浄し、ブロッキング液 (0.5%カゼインナトリウム, 3%スクロース, 150mM NaCl, 10mMリン酸緩衝液 (pH7.4)) 0.4mlを添加し、さらに室温で2時間静置した。ブロッキング液を除去後、真空乾燥した。

【0050】

血清100 μ lに、処理液 (15%SDS、2%Tween60) を50 μ l添加し、70℃にて30分間処理をおこない、その50 μ lを測定試料とした。

上記ウェルに反応緩衝液100 μ lと測定試料50 μ lを加え、室温で一夜反応させた。

【0051】

洗浄液 (0.05%Tween20, 0.15M NaCl, 10mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.4)) 0.4

mlで5回洗浄後、アルカリフォスファターゼ（AP）標識モノクローナル抗体HB91（認識部位1-19アミノ酸）およびHB110（認識部位21-40アミノ酸）をそれぞれ0.1 μ g/ml、0.5 μ g/mlに希釈し、100 μ l/ウェル添加し、室温1時間反応させた。洗浄液0.4mlで6回洗浄後、発光基質としてCDP-Star with Emerald II (TROPIX社) 溶液100 μ lを加え室温20分間反応させた後、発光を測定した。

【0052】

実施例 6. HBc抗原の測定

(A) 抗体固相プレートの作製

HBc抗原およびHBs抗原の両方に反応する3種のモノクローナル抗体HB44（認識部位31-49アミノ酸）、HB61（認識部位131-140アミノ酸）およびHB114（認識部位1-81アミノ酸）をマイクロタイタープレートウェルに感作し、固相化する。PBSで洗浄後、カゼインを含む溶液でブロッキングし、この溶液を除いた後、乾燥させる。

【0053】

(B) 検体の前処理

50 μ lの前処理液（15%ドデシル硫酸ナトリウム[SDS]、3%CHAPS、1%ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロマイド）を100 μ lの検体（血清、血漿など）と混合し、70℃にて30分処理する。

(C) 1次反応

各抗体固相ウェルに100 μ lの反応緩衝液（pH8.0）および前処理した検体を50 μ l加え、穏やかに攪拌しながら室温2時間反応させる。

【0054】

(D) 2次反応

ウェルを洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識HB50（認識部位168-176アミノ酸）モノクローナル抗体を含む溶液を100 μ l加え、室温1時間反応させる。

(E) 基質反応

ウェルを洗浄後、CDP Star with Emerald II (Applied Biosystems) を100 μ l加え、室温20分間反応後各ウェルの発光量をマイクロプレートルミノメーターで測定する。

【0055】

実施例 7. 検体中のHBVプレコア/コア蛋白、HBe抗原、HBc抗原の測定とその比率の計算

前記実施例 1 (A)の方法に従って、血清 7 検体についてショ糖密度勾配遠心法により分画を行った。それぞれの検体において、低密度の遊離のHBe抗原を含んでいる分画（例えば図 1 では1-19分画程度）と高密度のウイルス粒子を含んでいる分画（例えば図 1 では20分画以上）に分けて、実施例 5 および実施例 6 の方法で各抗原の測定を行った。

【0056】

低密度の画分を実施例 5 の方法で測定すると、この画分はウイルス粒子を含んでいない遊離のHBe抗原を測定している。また高密度の画分を実施例 5 の方法で測定すると、粒子状HBVプレコア/法で測定すると、この測定方法はHBc抗原を測定しているので、実施例 5 で測定した値から実施例 6 の値を減算することにより粒子状HBVプレコア/コア蛋白の値が計測可能である。このようにして測定、計算したHBe抗原、HBc抗原、HBVプレコア/コア蛋白のそれぞれの検体中の比を計算した。

【0057】

【表 1】

表 1

検体	(HBVプレコア/コア蛋白)/HBe抗原	(HBVプレコア/コア蛋白)/HBc抗原
BB1 PHM935A-14	13.437	27.236
BB1 PHM935A-16	6.321	158.352
BB1 PHJ201-04	0.589	22.070
BB1 PHJ201-07	1.367	44.853
BB1 PHJ201-13	0.296	33.743
ProMedDex#101499	0.025	12.031
ProMedDex#999077	1.653	12.779
平均	3.384	44.438

【0058】

(HBVプレコア/コア蛋白):HBe抗原は13:1~1:40であり、検体によっていずれかの抗原、蛋白を多く含むものが異なっている。一方、(HBVプレコア/コア蛋白):HBc抗原は12:1~158:1の範囲であり、すべての検体でHBVプレコア/コア蛋白を多く含んでいる。

【0059】

実施例 8. 検体処理法の比較

種類の検体前処理液を作製し、実施例 6 と同様にして前処理液だけを変化させ HBV陽性血清 5 検体の検体処理およびHBc抗原の測定を行い、各処理法の効果を比較した。

このうちSDS, N-Lauroyl sarcosin-Na, Deoxycholic Acid-Naは陰イオン性界面活性剤であり、n-Decyl trimethyl ammonium-Brは陽イオン性界面活性剤である。検体処理中の各界面活性剤の終濃度は前処理液中の 1/3 に、HBc抗原測定系における 1 次反応中の終濃度は 1/9 となる。

【0060】

【表 2】

表 2 各処理法での HBc 抗原 ELISA での反応（発光量）

前処理液	なし	15% SDS	15% N-Lauroyl sarcosin-Na	7.5% Deoxycholic Acid-Na	15% n-Decyl trimethyl ammonium-Br
陰性	180	154	158	156	503
検体 1	364	46656	4208	1375	1381
検体 2	212	4249	510	459	357
検体 3	151	2157	1323	141	311
検体 4	167	2487	430	143	292
検体 5	153	1609	300	180	378

【0061】

この結果から処理液として SDS, N-Lauroyl sarcosin-Na, Deoxycholic Acid-Na などの陰イオン性界面活性剤が適していることが明らかとなった。このうち特に SDS が適している。一方 n-Decyl trimethyl ammonium-Br などの陽イオン性界面活性剤を単独で用いることは、陰性検体でのバックグラウンドも高く、この測定系には適さない。

【0062】

【表 3】

表 3 各処理法での HBc 抗原 ELISA での反応（発光量）

前処理液	15% SDS	15% SDS, 1.5% CHAPS	15% SDS, 1.5% CHAPS 0.3% Triton-X100
陰性	29	26	42
検体 1	35009	45368	50818
検体 2	2323	3739	4316
検体 3	541	903	1046
検体 4	1327	2048	2158
検体 5	532	690	773

【0063】

この結果から前処理液として15% SDSに加え、両性界面活性剤であるCHAPSあるいはさらに非イオン性界面活性剤であるTriton-X100などを加えることにより、前処理の効果がさらに高くなることが明らかとなった。

【0064】

【配列表】

配列表

<110> 先端生命科学研究所

<120> 粒子形成能を有するHBVプレコア/コア蛋白

<130> 1024582

<160>

<210> 1

<211> 178

<212> TRP

<400> 1

Gln Leu Phe His Leu Cys Leu Ile Ile Ser Cys Ser Cys Pro Thr Val
5 10 15

Gln Ala Ser Lys Leu Cys Leu Gly Trp Leu Trp Gly Met Asp Ile Asp
20 25 30

Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Ser Val Glu Leu Leu Ser Phe Leu Pro
35 40 45

Ser Asp Phe Phe Pro Ser Ile Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser Ala
50 55 60

Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys Ser Pro His His
65 70 75 80

Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu Leu Met Asn Leu
85 90 95

Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp Pro Ala Ser Arg Glu Leu
100 105 110

Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys Ile Arg Gln Leu
 115 120 125

Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val Leu
 130 135 140

Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala Tyr
 145 150 155 160

Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val
 165 170 175

Val Arg

【 0 0 6 5 】

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<400> 2

Gln Leu Phe His Leu Cys Leu Ile Ile Ser Cys Ser Cys Pro Thr Val
 5 10 15

Gln Ala Ser Lys

20

【 0 0 6 6 】

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<400> 3

Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg
 5 10

【 0 0 6 7 】

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<400> 4

Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys Ser Pro His His Thr Ala Leu

5

10

15

Arg

【0068】

<210> 5

<211> 14

<212> PRT

<400> 5

Glu Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys

5

10

【0069】

<210> 6

<211> 23

<212> PRT

<400> 6

Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu

5

10

15

Pro Glu Thr Thr Val Val Arg

20

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、HBVプレコア/コア蛋白、HBe抗原、シグナル配列を持つHBe抗原、およびHBc抗原のアミノ酸の領域と各抗原の血液中での様態を示す図である。

【図2】

図2は、ショ糖密度勾配遠心法にて分離したHBe抗原陽性血清のHBV抗原、HBV DNAの挙動を示す図である。各分画中のHBVコア関連抗原（黒正方形）、HBc抗原（●）、HBs抗原（◇）、HBe抗原（□）、およびHBV DNA（○）をそれぞれ示し、分画の密度を破線で示す。

【図 3】

図 3 は、シヨ糖密度勾配遠心法にて分離したHBVコア関連抗原ピーク画分を再びシヨ糖密度勾配遠心法にて分離したときのHBV抗原、HBV DNAの挙動を示す図である。各分画中のHBVコア関連抗原（黒正方形）、HBc抗原（●）、HBs抗原（◇）、およびHBV DNA（○）をそれぞれ示し、分画の密度を破線で示す。

【図 4】

図 4 は、HBV抗原のゲルろ過での挙動を示す図である。上図、シヨ糖密度勾配遠心法にて分離したHBVコア関連抗原ピーク画分を、未処理のままゲルろ過した場合。下図、同じサンプルを3% NP-40処理後ゲルろ過した場合。各分画中のHBVコア関連抗原（黒正方形）、HBc抗原（●）量を示す。分子量マーカーの溶出位置を上部に示す。

【図 5】

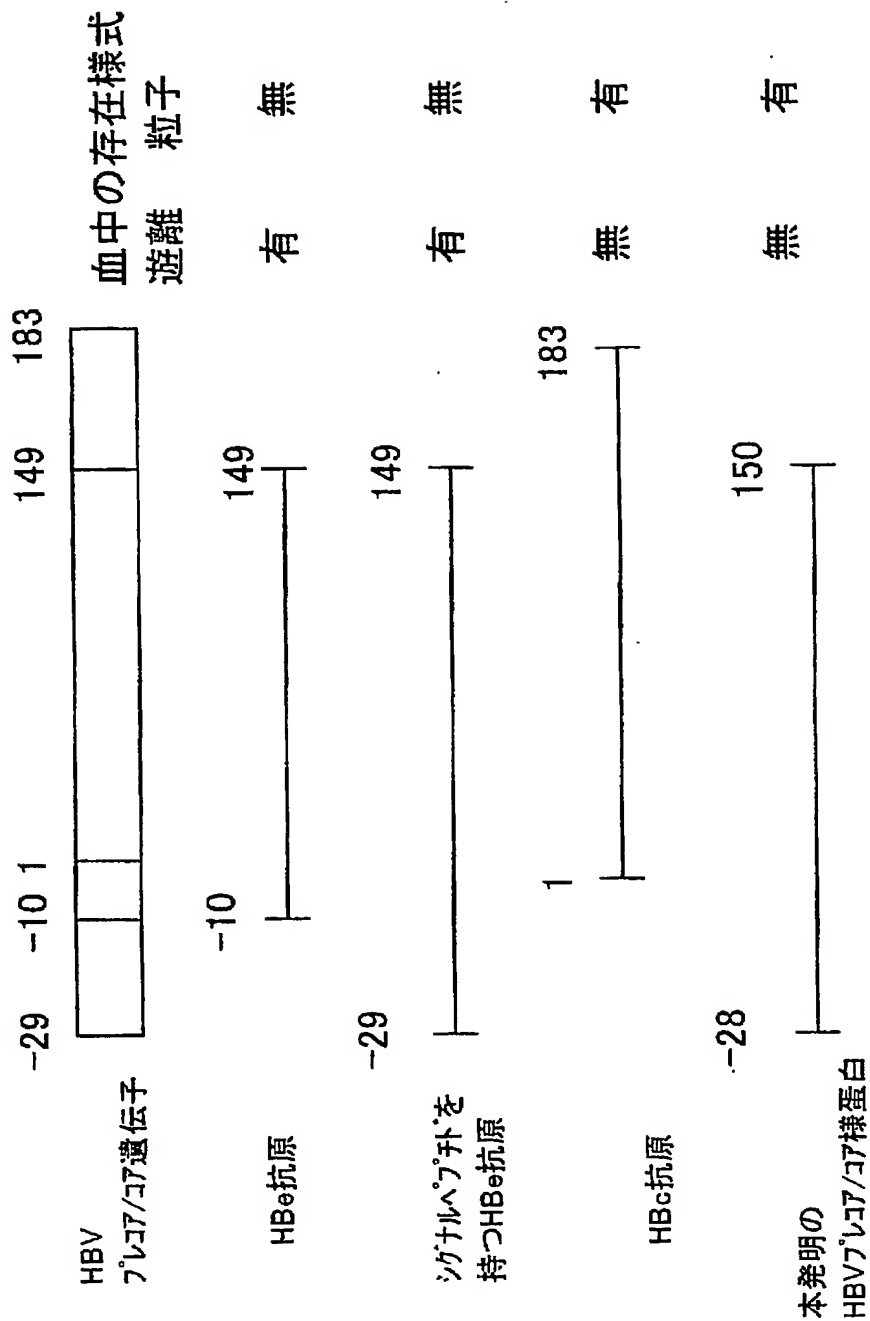
図 5 は、HBe抗原陽性血清およびその密度勾配遠心分画をウエスタンブロット解析した結果を示す電気泳動図であり、図面代用写真である。密度勾配遠心分画1～20がシヨ糖濃度10～60%に相当する。HB50はHBc抗原にのみ反応し、HB91はHBc抗原HBe抗原両方に反応するモノクローナル抗体である。

【書類名】

図面

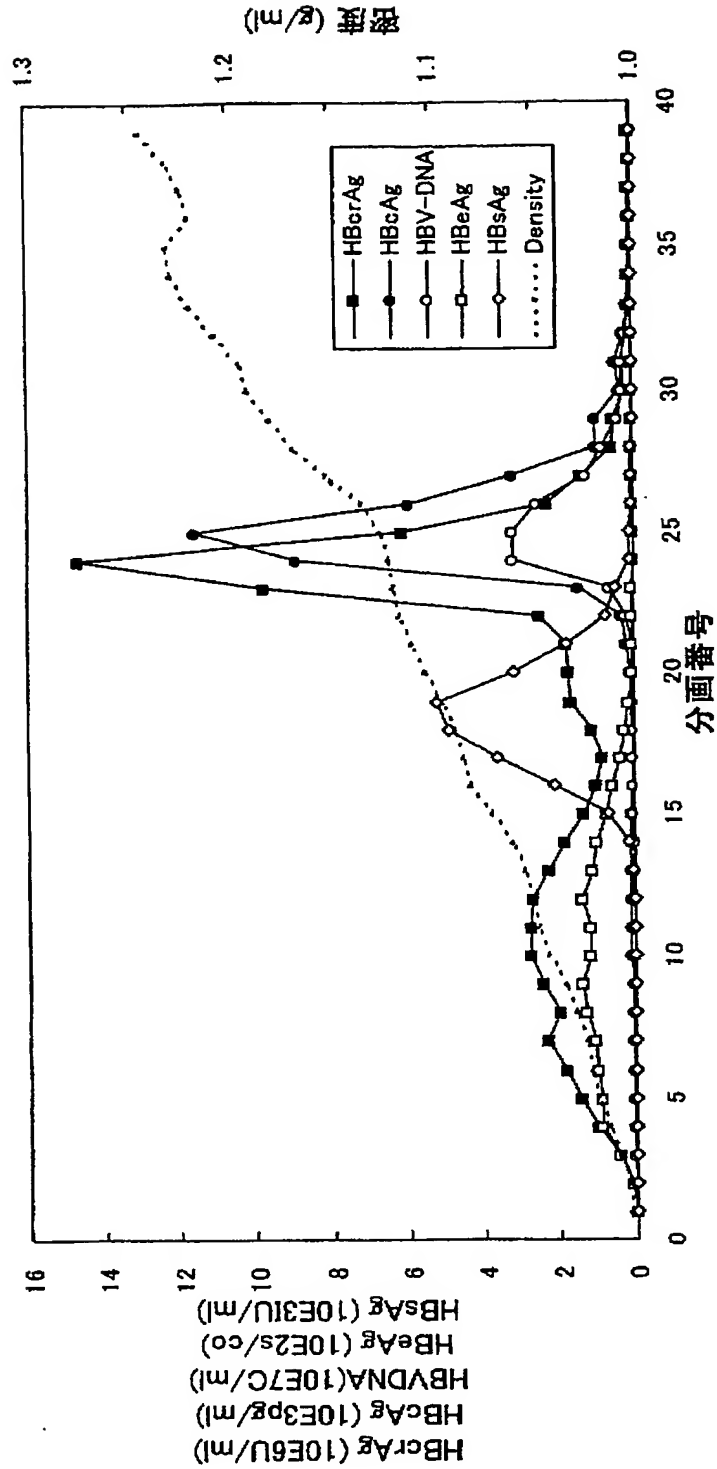
【図1】

図1



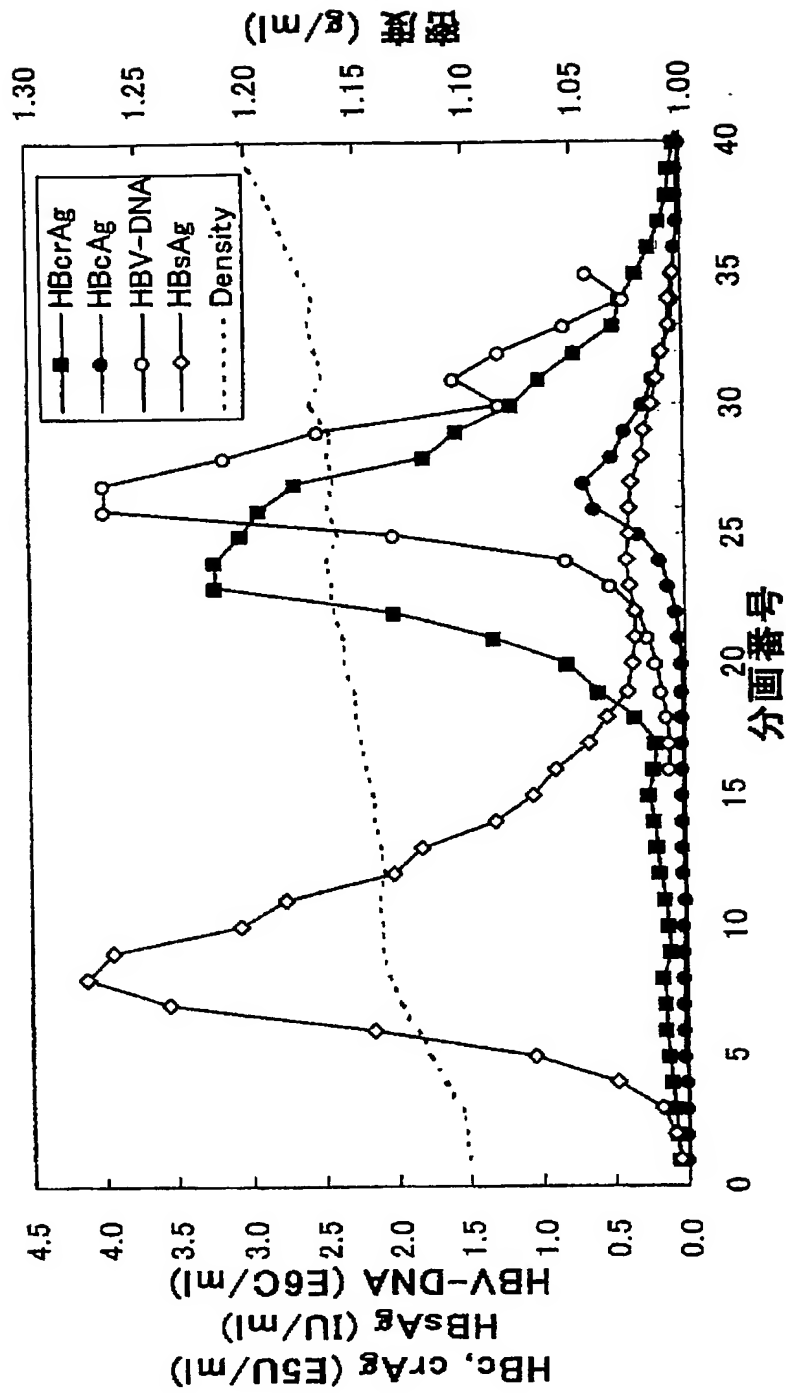
【図2】

図2



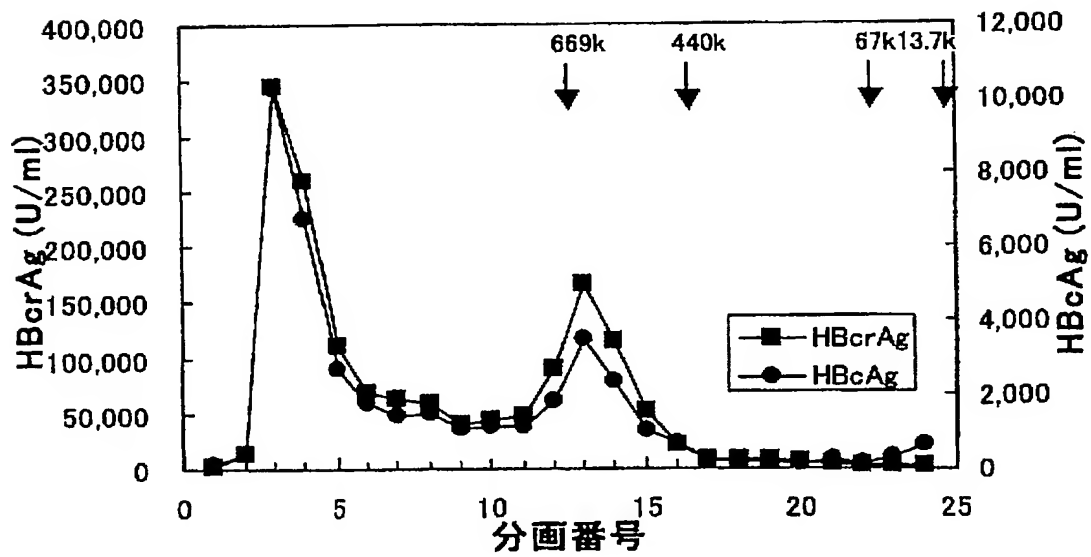
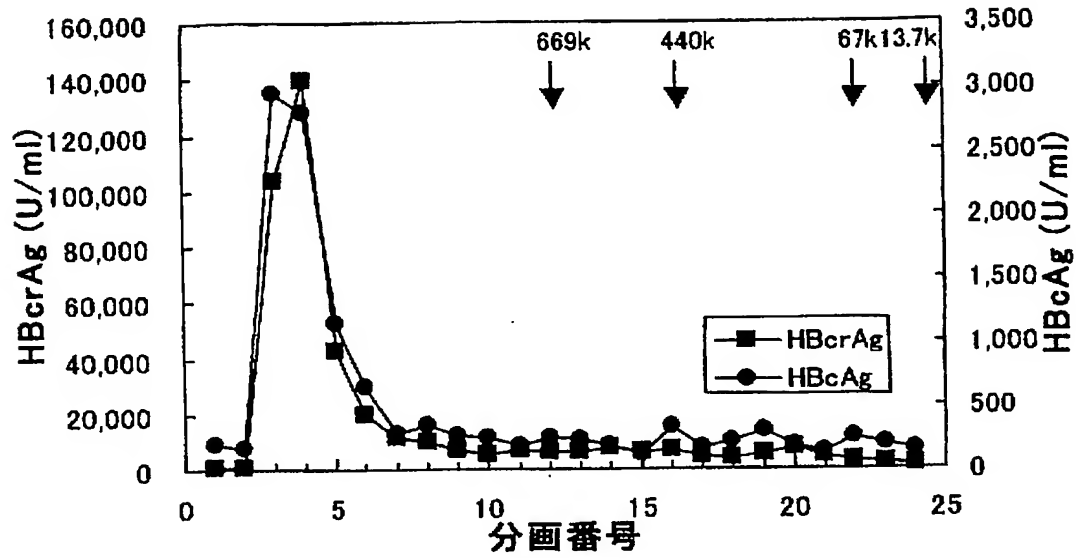
【図3】

図3



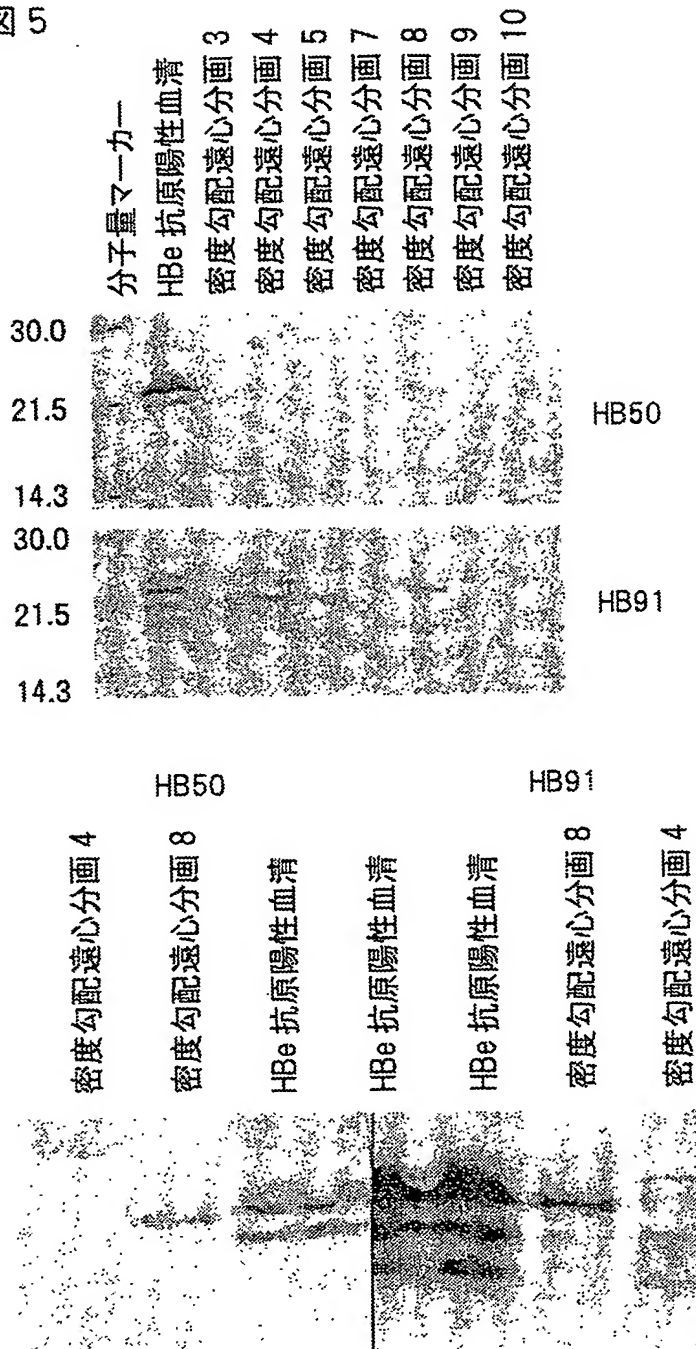
【図 4】

図 4



【図 5】

図 5



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 粒子形成能を有するHBVプレコア/コア蛋白およびその測定手段を提供することである。

【解決手段】 HBVのウイルス（様）粒子を形成する新規なHBVプレコア/コア蛋白を同定した。本発明はこの新規なHBVプレコア/コア蛋白を提供する。さらにこのHBVプレコア/コア蛋白によって形成される、コア様粒子、ウイルス様粒子を提供する。このウイルス様粒子はワクチン、治療薬に利用できる。さらに本発明はHBVプレコア/コア蛋白の測定法を提供する。

【選択図】 図1

特願2002-261666

出願人履歴情報

識別番号

[399115851]

1. 変更年月日

1999年10月14日

[変更理由]

新規登録

住所

埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡一丁目3番1号

氏名

株式会社先端生命科学研究所

2. 変更年月日

2001年 7月31日

[変更理由]

住所変更

住所

埼玉県和光市丸山台2丁目10番23号

氏名

株式会社先端生命科学研究所

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.